

of the tail to the 7<sup>th</sup> mm showing consistently about 10% more activity than the adjoining 2 mm slice (7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> mm). This confirms the gradient-like distribution shown previously<sup>3</sup>. The slight loss of activity in these two tissue pieces from the 8<sup>th</sup> to the 19<sup>th</sup> day is not statistically significant. The regenerates, on the other hand, show a marked decrease in catalase activity to about 50% of the level found in the corresponding region of the non-amputated tails (0–7 mm). Only towards the end of the regeneration period does the activity seem to increase again, to a very slight extent. That this decrease is specific for the regenerating tissue is shown by the unchanged level of activity in the adjoining 2 mm stump slices. This behaviour is in contrast to the results found in regenerating rat liver, where catalase activity is not decreased<sup>4</sup>. It is also in contrast to our own results with the cathepsins<sup>5</sup>, which in the regenerates return to the normal level within 10 days after amputation, i.e. when the regenerates are fully differentiated and further growth proceeds without gain in nitrogen content<sup>6</sup>. In the case of catalase, the abnormally low level is maintained, and in this respect the regenerates keep their specific characteristics even after differentiation is completed.

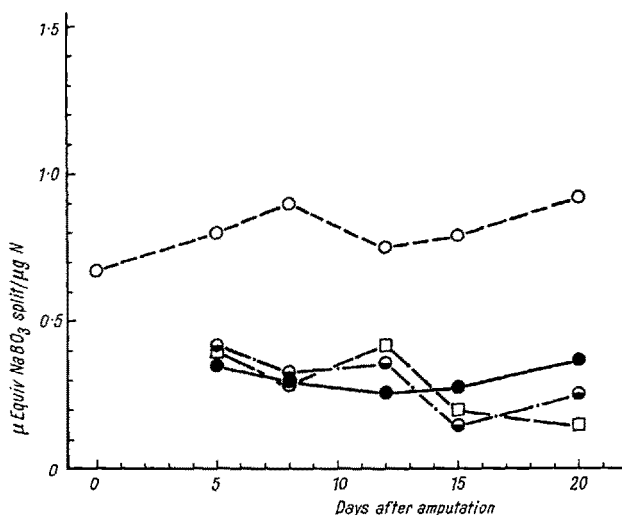


Fig. 2.—Specific catalase activity during regeneration in a 1:4000 solution of AT. ● Regenerates, ■ stump slices, □ 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> mm of the tails of the amputated larvae treated with AT, ○ 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> mm of the tails of the untreated controls.

A concentration of 1:4000 of AT inhibited catalase in the tail tissue of amputated and non-amputated larvae (Fig. 2). Both in the regenerates and in the stump slices of the amputated larvae as well as in the 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> mm slices of the treated, non-amputated controls the activity was depressed to about the same level, namely 20–40% of the untreated controls. In the regenerates, catalase activity was decreased to a much smaller extent than in the stump and control slices. Here the level falls only to about 60 to 70% of the untreated regenerates (see Fig. 1). It seems as if at the AT concentration used, a definite minimum level of catalase activity is maintained in the treated tissues.

The regeneration of tail tissue was partly inhibited by AT during the first days after amputation. On the 5<sup>th</sup> day, AT-treated regenerates measured only 0.55 mm (average of 50) while untreated regenerates measured 1.00 mm

(average of 10). But by the 12<sup>th</sup> day treated regenerates averaged 3.99 mm to 3.78 mm for the untreated, and at the end of the experiment (20<sup>th</sup> day) the values were 5.20 and 4.45 mm respectively. Thus it seems that those cells in the young blastema which survived the first effects of the treatment retained their full vitality, since the tissue as a whole did not lose any of its regenerative power.

One is led to the conclusion that the blocking of catalase in the regenerate does not in itself affect any vital metabolic pathway, and that the inhibition observed may possibly be due to a contaminating substance with a specific effect on the early phases of regeneration. The presence of such biologically active 'aminotriazole contaminant' has been discussed by FEINSTEIN *et al.*<sup>10</sup>. It should be possible to separate the catalase-blocking and the regeneration-inhibiting components of AT-preparations and thus identify the active agents. Such work is at present in progress and will be reported on later.

H. P. VON HAHN

Zoologisches Institut der Universität Bern, June 17, 1959.

### Zusammenfassung

In der regenerierenden Schwanzspitze der *Xenopus*-larve bleibt die Katalase-Aktivität (bezogen auf Totalstickstoff) bis zum Ende der Regenerationsperiode auf etwa 50% des normalen Niveaus, während sie im anschließenden Schwanzstumpf unverändert ist. 3-Amino-1,2,4-triazol erniedrigt die Katalase-Aktivität in den Regeneraten, den Stümpfen und dem Kontrollgewebe nicht-amputierter Larven auf etwa 20–40% des normalen Niveaus. Es bewirkt eine kurzfristige Regenerationshemmung in den ersten Tagen nach Amputation, die im weiteren Verlauf wieder vollständig ausgeglichen wird.

<sup>10</sup> R. N. FEINSTEIN, S. BERLINER, and F. O. GREEN, *Arch. Biochem. Biophys.* 76, 32 (1958).

### Die Komplement-hemmende Wirkung einiger Antiproteasen

Zum Wirkungsmechanismus des Komplements bei immunologischer Hämolyse gehört eine primäre Aktivierung von C<sub>1</sub> durch den Antigen-Antikörper-Komplex (eventuell auch eine unspezifische Aktivierung durch die proteolytischen Enzyme Plasmin und Trypsin) zu «aktivem C<sub>1</sub>», welches die Eigenschaften einer Protease mit Esterase-Aktivität aufweisen soll<sup>1–3</sup>. Die Hemmung dieser ersten Stufe und damit des ganzen Komplements könnte für Allergie und Immunohämatologie von grosser Bedeutung sein<sup>3,4</sup>. CUSHMAN *et al.*<sup>5,6</sup> beobachteten die hemmende Wirkung von Substanzen wie *p*-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester, einigen Polypeptiden, Aminosäuren und Diisopropylfluorophosphat; diese waren jedoch entweder zu wenig aktiv oder wegen ihrer Toxizität therapeutisch nicht verwendbar.

<sup>1</sup> E. L. BECKER, *J. Immunol.* 77, 462 (1956).

<sup>2</sup> E. L. BECKER, *J. Immunol.* 77, 469 (1956).

<sup>3</sup> E. L. BECKER, *J. All.* 29, 3 (1958).

<sup>4</sup> H. FISCHER, W. FRITSCH und H. ARGENTON, *Klin. Wschr.* 36, 411 (1958).

<sup>5</sup> W. F. CUSHMAN, E. L. BECKER und G. WIRTZ, *J. Immunol.* 79, 80 (1957).

<sup>6</sup> L. LEVINE, *Biochim. biophys. Acta* 18, 283 (1955).

<sup>9</sup> E. M. DEUCHAR, R. WEBER, and F. E. LEHMANN, *Helv. physiol. Acta* 15, 212 (1957).

Wir prüften die Komplement-hemmende Wirkung einiger Antiproteasen aus Pankreas, Sojabohnen, Phaseolus, Kartoffeln und Ovomuroid sowie den Einfluss der IV. Äthanolfraktion des Plasmas, indem die Verminderung oder Aufhebung der Lyse von sensibilisierten Hamelerythrozyten durch Zugabe dieser Stoffe beobachtet wurde.

**Methodik.** – *Hamelerythrozyten.* Hammelblut wurde steril in die Alsever-Lösung entnommen und durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert. Die abzentrifugierten Erythrozyten wurden anschliessend zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung und einmal mit Veronalpuffer von pH 7,4<sup>7</sup> gewaschen. Zur Standardisierung wurde eine 5%ige Blutkörperchensuspension hergestellt, die  $10^6$  Erythrocyten pro ml enthalten sollte. Die Sensibilisierung erfolgte durch den Ambozeptor (1 ml Suspension + 1 ml Puffer pH 7,4 + 4–8 Ambozeptoreinheiten wurden 10 min bei 37°C inkubiert), dann wurde die Suspension auf eine Konzentration von 0,4% verdünnt.

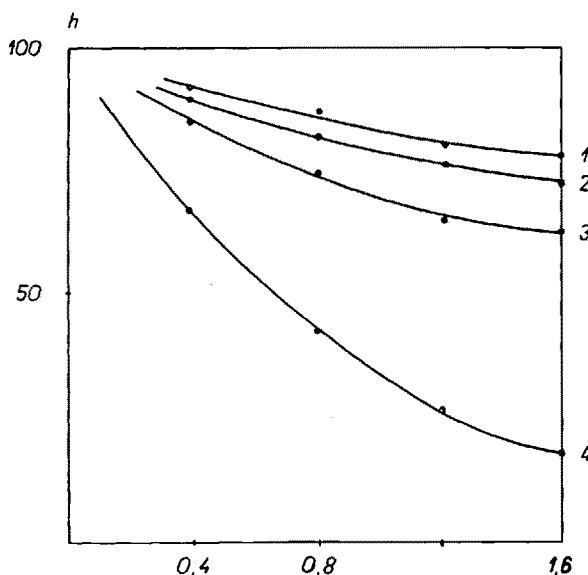


Abb. 1. Hemmende Wirkung von Antiproteasen auf das hämolytische System. 1: Inhibitor aus Kartoffeln, 2: aus Pankreas, 3: aus Phaseolus, 4: aus Sojabohnen; *h*: Hämolyse in Prozenten (Hämolyse ohne Inhibitor = 100%), *i*: Konzentration des benutzten Inhibitors in %.

**Komplement.** Als Komplementquelle diente humanes RP-Serum, das heisst Serum, aus welchem das Properdin mit Hilfe von Zymosan entfernt worden war<sup>8</sup>.

**Antiproteasen.** Es wurden Inhibitoren aus Pankreas und Phaseolus<sup>9</sup>, der teilweise gereinigte Inhibitor aus Sojabohnen, der chromatographisch gereinigte Inhibitor aus Kartoffeln<sup>10</sup>, die IV. Plasmafraktion nach COHN sowie Ovomuroid verwendet. Die Substanzen wurden in Veronalpuffer von pH 7,4 gelöst. Zum hämolytischen System wurde von dieser Lösung so viel zugegeben, dass die zu prüfenden Substanzen in Konzentrationen von 0–1,6 g% vorhanden waren. Die Antitrypsin- und Antiplasminaktivitäten der untersuchten Antiproteasen sind in Abbildung 3 und 4 wiedergegeben.

<sup>7</sup> L. PILLEMER, L. BLUM, I. H. LEPOW, O. A. ROSS, E. W. TODD und A. C. WARDLAW, *Science* 120, 279 (1954).

<sup>8</sup> H. C. ISLIKER und E. LINDER, *Vox Sang.* 3, 23 (1958).

<sup>9</sup> V. MANSFELD, A. ZIEGELHÖFER, Z. HORÁKOVÁ und J. HLADOVEC, *Naturwiss.* 46, 172 (1959).

<sup>10</sup> V. MANSFELD und J. HLADOVEC, im Druck (1959).

Zur Feststellung der *Antiplasminaktivität* wurde die Hemmung der durch Plasmin<sup>11</sup> bedingten Lyse des Fibrinkoagulums gemessen.

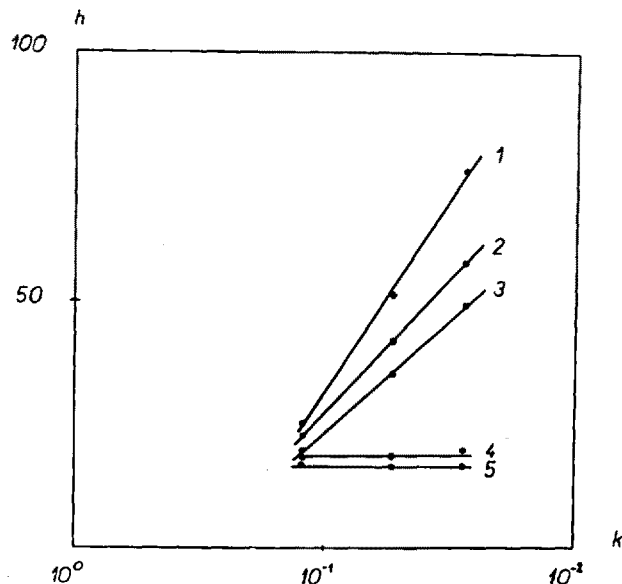


Abb. 2. Komplementhemmende Wirkung von Antiproteasen und Properdin in Gegenwart von Zymosan bei 37°C. Inaktivierung des Komplements durch Rattenproperdin (1); Inaktivierung des Komplements durch Rattenproperdin + Antiprotease aus Pankreas (2), Phaseolus (3), Sojabohnen (4), Kartoffeln (5). Konzentration der Inhibitoren: 0,8%; *h*: Hämolyse; *k*: Konzentration des Properdins.

Die *Antitrypsinaktivität* wurde aus dem Grad der Hemmung einer proteolytischen Spaltung von Kasein bestimmt<sup>12</sup>.

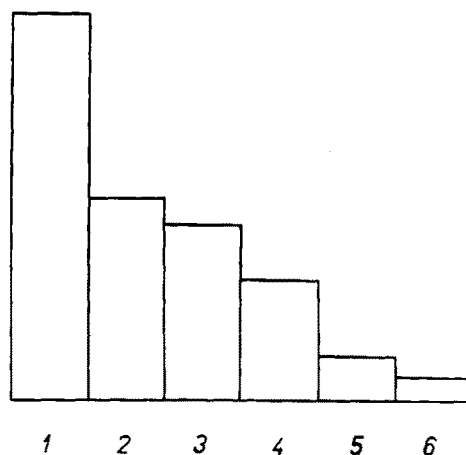


Abb. 3. Relative Hemmung von Trypsin durch Antiproteasen. Der Inhibitionseffekt der Pankreasantiprotease wurde als Basis genommen und die Wirkung der übrigen Inhibitoren im Verhältnis zum Pankreasinhibitor bestimmt. 1 = Inhibitor aus Pankreas, 2 = Ovomuroid, 3 = aus Sojabohnen, 4 = aus Phaseolus, 5 = aus Kartoffeln, 6 = IV. Fraktion von Humanplasma.

**Properdin.** Als Properdinquelle wurde Rattenserum verwendet und die Properdinaktivität nach ISLIKER<sup>8</sup> bestimmt.

<sup>11</sup> M. RYBÁK und J. REJNEK, *Clin. chim. Acta* 4, im Druck (1959).

<sup>12</sup> J. HLADOVEC und V. MANSFELD, *Coll. Czech. chem. Comm.* 23, 1796 (1958).

**Versuchsordnung.** In die Reagensgläser wurden folgende Lösungen pipettiert:

0,1 ml RP-Serum  
0–0,4 ml Inhibitor  
0,4–0 ml Puffer pH 7,4.

Das Volumen des Systems betrug immer 0,5 ml, die Konzentration des Inhibitors variierte von 0 bis 1,6 g%. Die Lösung wurde während 15 min bei 37°C inkubiert; dann wurden 2 ml Erythrozytensuspension zugefügt und das Gemisch weitere 30 min bei gleicher Temperatur gehalten. Nach der Inkubation wurde die Suspension zentrifugiert und photometrisch (Uvicam) die Extinktion gemessen. Eine Hämolyse ohne Inhibitorzugabe wurde als 100% angenommen (Abb. 1).

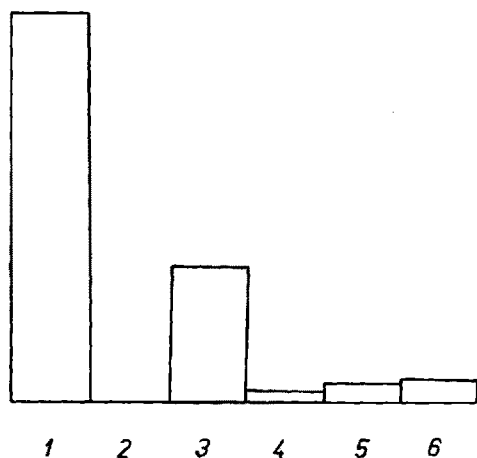


Abb. 4. Relative Hemmungswirkung von Antiproteasen auf Plasmin. Der Inhibitionseffekt der Antiprotease aus Pankreas wurde als Basis genommen und die Wirkung der übrigen Inhibitoren im Verhältnis zum Pankreasinhibitor bestimmt. 1 = Inhibitor aus Pankreas, 2 = Ovomuroid, 3 = aus Sojabohnen, 4 = aus Phaseolus, 5 = aus Kartoffeln, 6 = IV. Fraktion von Humanplasma.

Die Antiproteasewirkung auf das hämolytische System äusserte sich in einer Hemmung der prozentualen Lyse, wie Abbildung 1 und 2 zeigen. Die intensivste Wirkung besass der aus Sojabohnen hergestellte Inhibitor, während die aus Pankreas, Phaseolus und Kartoffeln gewonnenen Präparate eine relativ geringere Hemmung ergaben. Ovomuroid war ohne jeglichen Effekt. Die native IV. Plasmafraktion zeigte eine Properdin-hemmende Wirkung, die nach Erwärmung auf 60°C allmählich verschwand.

Die hemmende Wirkung von Properdin auf  $C'_3$  in Gegenwart von Zymosan bei 37°C wurde durch die Inhibitoren mit Ausnahme der IV. Fraktion nicht gestört; die resultierende Hämolyseverminderung setzte sich aus der inaktivierenden Wirkung des Properdins und der Komplementhemmung durch die Antiproteasen zusammen. Bei Inhibitoren aus Sojabohnen und Kartoffeln überstieg die aktuelle Inhibition die Summe beider Inaktivierungswirkungen (Abb. 2).

Die hier beobachtete Komplement-Hemmung durch Antiproteasen liefert einen weiteren Beweis für den Proteasencharakter mindestens einer Komplementkomponente ( $C'_1$ ). Wir sind ferner der Ansicht, dass dieser Inhibitionseffekt in der Therapie einiger allergischer Erkrankungen und vielleicht auch der toxischen hämolytischen Anämien ausgenutzt werden könnte.

M. RYBAK, M. PETAKOVA, V. MANSFELD,  
and J. HLADOVEC

Institut für Hämatologie und Bluttransfusion und Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag, 7. Mai 1959.

### Summary

The complement-inhibiting action of some antiproteases (i.e. the inhibitors from pancreas, soybeans, Phaseolus, potatoes, ovomucoid, and the effect of the IV. ethanol plasma fraction) has been observed. It was found that the antiproteases produced from soybeans, pancreas, Phaseolus, and potatoes possess the inhibitory effect.

### On the Distribution in Brain of Monoamines and of Enzymes Responsible for their Formation

In a previous investigation, the distribution of noradrenaline and dopamine in the brains of several mammalian species was mapped out<sup>1,2</sup>. High amounts of noradrenaline were detected in the hypothalamus and other parts of the brain stem, whereas dopamine was found to be localized almost exclusively in the nuclei of the corpus striatum of the cerebral hemispheres. The brain parts rich in catechol amines also proved to have high L-dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase

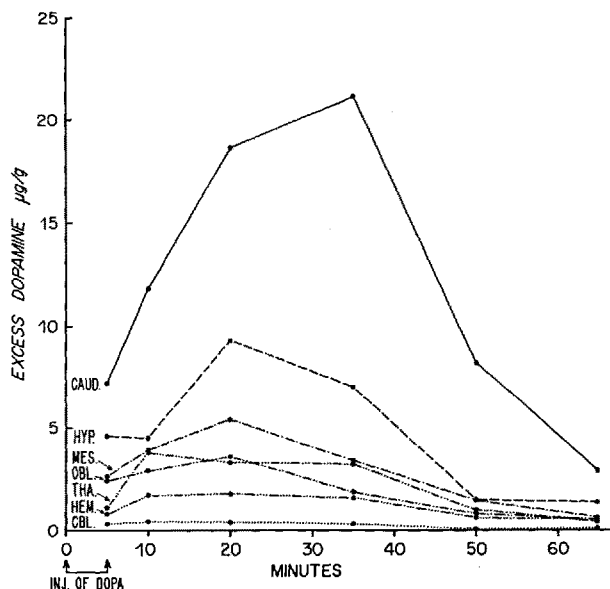


Fig. 1.—Excess concentrations of dopamine in different brain parts at varying intervals of time after injection of DOPA.

Caud.: Caudate nucleus. Hyp.: Hypothalamus. Mes.: Mesencephalon. Obl.: Medulla oblongata + pons. Tha.: Diencephalon (not hypothalamus). Hem.: Hemispheres (not corpus striatum). Cbl.: Cerebellum

activities *in vitro*. These and other data seemed to indicate that the two amines were involved in the functions of different regions of the brain. The investigation has now been continued and some additional data are given in this paper.

It was thought of interest to study the distribution of noradrenaline and dopamine in some further detail. The

<sup>1</sup> Å. BERTLER and E. ROSENGREN, *Exper.* 15, 10 (1959).

<sup>2</sup> Å. BERTLER and E. ROSENGREN, *Acta physiol. Scand.* (in press).